

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenl gungsschrift
⑩ DE 42 36 237 A 1

⑤1 Int. Cl.⁵:
C07 H 15/04
C 07 H 15/20
C 07 H 15/252
A 61 K 31/70

⑳1 Aktenzeichen: P 42 36 237.7
⑳2 Anmeldetag: 27. 10. 92
⑳3 Offenlegungstag: 28. 4. 94

DE 42 36 237 A 1

⑦1 Anmelder:
Behringwerke AG, 35039 Marburg, DE

⑦2 Erfinder:
Bosslet, Klaus, Dr., 35037 Marburg, DE; Czech, Jörg,
Dr., 35041 Marburg, DE; Hoffmann, Dieter, Dr., 35041
Marburg, DE; Kolar, Cenek, Dr., 35037 Marburg, DE;
Tillequin, François, Dr., Paris, FR; Florent,
Jean-Claude, Dr., Les Ulis, FR; Azoulay, Michel, Dr.,
Paris, FR; Monneret, Claude, Prof., Paris, FR;
Jacquesy, Jean-Claude, Prof., Buxerolles, FR;
Gesson, Jean-Pierre, Prof., Chansseneuve du Poitou,
FR; Koch, Michel, Prof., La Celle Saint Cloud, FR

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Prodrugs, ihre Herstellung und Verwendung als Arzneimittel

⑤7 Es werden Substrat-Spacer-Wirkstoff-Verbindungen (Pro-
drugs), ihre Herstellung sowie ihre Verwendung als Arznei-
mittel beschrieben.

DE 42 36 237 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Substrat-Spacer-Wirkstoff-Verbindungen (Prodrugs) ihre Herstellung sowie ihre Verwendung als Arzneimittel.

5 Die Therapie bösartiger Tumore, entzündlicher Erkrankungen, oder Autoimmunerkrankungen ist neben der unzureichenden Wirksamkeit der Therapeutika meist mit starken Nebenwirkungen verbunden. Dieser Mangel kann hauptsächlich mit der zu geringen in vivo Selektivität der eingesetzten Wirkstoffe erklärt werden. So lassen sich in vielen Fällen die günstigen in vitro pharmakologischen Eigenschaften der Wirkstoffe in vivo nicht bestätigen.

10 Seit vielen Jahren beschäftigen sich Wissenschaftler, allerdings ohne durchgreifenden Erfolg, mit diesem Problem. Eine Forschungsrichtung beschäftigte sich mit der Herstellung und Verwendung von Substanzen, die in vivo zu Prodrugs metabolisiert werden, die anschließend ortsspezifisch durch Enzyme zu den Wirkstoffen (drugs) gespalten werden. So benutzten Sweeney und Mitarbeiter (Cancer Research 31, 477—478, 1971) Mycophenolsäure, die in vivo zu inertem Mycophenolsäureglucuronid metabolisiert wird, zur Behandlung von bösartigen Tiertumoren. Die beobachteten Effekte auf das Tumorstückwachstum erklären die Autoren durch enzymatische Abspaltung von Glucuronsäure durch im Tumor extrazellulär, d. h. auf der Tumorzellmembran vorhandene Glucuronidase, gefolgt von der Aufnahme von Mycophenolsäure in die Tumorzellen. Vom Konzept her identische Therapieversuche haben Young et al. (Cancer 38, 1887—1895, 1976) mit Anilinsenfägas im Rahmen einer klinischen Prüfung durchgeführt. Sie behandelten Tumorpacienten, deren Tumore auf hohe β -Glucuronidasewerte geprüft wurden, mit Anilinsenfägas, welches entsprechend ihrer Hypothese in der Leber nach Hydroxylie-
20 rung glucuronidiert und am Tumor durch β -Glucuronidase zu toxischem Hydroxylanilinsenfägas gespalten werden sollte. Die therapeutischen Erfolge waren allerdings eher enttäuschend.

Eine weitere Forschungsrichtung ging einen Schritt weiter und stellte chemisch z. B. Anilinsenfägasglucuronsäuremethylester oder 6-Mercaptopuringlucuronid her. Diese Prodrugs zeigten allerdings nur einen niedrigen
25 Detoxifizierungsgrad, was einer in vivo Anwendung entgegenstand. Günstigere Eigenschaften zeigten die 5-Fluorouracil O- β -D-glucuronid(FUOG)- oder 5-Fluorouracil N-glucuronid(FUNG) Verbindungen einer japanischen Arbeitsgruppe (Baba et al. Gann, 69, 283-284, 1978). Die Glucuronidierung von 5-Fluorouracil erhöhte die LD50 von 200 mg/kg für 5-FU auf 5000 mg/kg für das entsprechende Glucuronid. Deutliche Wirkung wurde allerdings nur mit FUOG nach zehnmaliger i.v. Gabe und Glucoseansäuerung bei der Behandlung eines Mammakarzinoms erhalten. Allerdings muß hier betont werden, daß die Behandlung bereits 24 Stunden nach
30 Implantation eines Tumorstückchens begonnen wurde, ein Zeitpunkt, zu dem mit Sicherheit noch nicht von einem etablierten Tumor gesprochen werden kann. Wahrscheinlich bedingt durch potentielle Gewebezestörung während der Implantation wurde im Tumor lysosomale Glucuronidase freigesetzt, die kombiniert mit der durch Glucosebehandlung verbundenen pH Absenkung zu in vivo Wirksamkeit führte. Die Relevanz dieses Modells für die klinische Situation erscheint allerdings sehr fraglich. Die Tatsache, daß bis heute noch kein
35 Therapeutikum aus diesen Verbindungen entstanden ist, deutet auf die geringe in vivo Wirksamkeit der Verbindungen hin.

Eine Verbesserung der Wirksamkeit von Prodrugs hat sich die Arbeitsgruppe um Katzenellenbogen (WO 81/01145) dadurch versprochen, daß sie anstatt der Glucuronyl-drugs Peptidspacer-drugs synthetisiert hat.
40 Als aktivierende Enzyme sollen hierbei tumorassoziierte fibrinolytische oder koagulierende Proteasen wie z. B. Plasmin oder Plasminogenaktivatoren dienen. In vivo pharmakologische Wirksamkeit ist weder mit den in WO 81/01145 noch mit den in Journal of Medicinal Chemistry, 24, 479—480 (1980) beschriebenen, durch Proteasen in vitro aktivierbaren Doxorubicin- und Arabinosylcytosinspacerpeptiden gezeigt worden. Vor dem Hintergrund unseres heutigen Wissens über das ubiquitäre extrazelluläre Vorkommen oben genannter Proteasen im menschlichen Körper ist die fehlende selektive in vivo Wirksamkeit der oben synthetisierten Verbindungen erklärbar.

Trotz einer Vielzahl von Hinweisen aus der oben zitierten Literatur über die nicht sehr erfolgreiche Verwendung von Glucuronsäure-haltigen Prodrugs, auch in Kombination mit Glucoseansäuerung (Baba, T. et al., Gann 69, 283—284, 1978) erhielt Rubin im Jahre 1984 ein US Patent (No. 4 481 195), in welchem er die Verwendung von Glucuronsäure-Wirkstoffverbindungen nach Ansäuerung des Tumors und Alkalisierung des Normalgewebes
50 vorschlägt. Aus dieser Erfindung sind anscheinend noch keine verwendbaren klinisch erfolgreichen Therapeutika hervorgegangen.

Außerdem wurden durch Esterasen spaltbare Buttersäure-Prodrugs beschrieben. Allerdings zeigte sich, daß die therapeutischen Effekte der aus den Prodrugs in vivo freigesetzten Buttersäure denen eines Standardzytostatikums (Cisplatin) unterlegen sind.

55 Alle soweit diskutierten Arbeiten gehen von einer Aktivierung von Prodrugs durch körpereigene Enzyme aus. Die mit diesem Prinzip erzielbaren in vivo-therapeutischen Effekte scheinen aber der Standard-Chemotherapie nicht überlegen zu sein.

Unabhängig von der bisher beschriebenen Forschungsrichtung (Prodrug-Aktivierung durch körpereigene Enzyme) entwickelte sich eine neue Forschungsrichtung, die versuchte nach Prälokalisierung von xenogenen
60 Antikörperenzymkonjugaten im Zielgewebe Prodrugs selektiv im Zielgewebe zu zytotoxischen Drugs zu spalten. (Philpott et al. Surgery 74, 51, 1973; Cancer Res. 34, 2159, 1974). Bagshawe (WO 88/07378) schlug, basierend auf den Arbeiten von Philpott, die Verwendung von xenogenen Antikörperenzymkonjugaten in Kombination mit Prodrugs zur Behandlung von Tumoren vor. Er verwendete Mausmonoklonale Antikörper, die er chemisch an bakterielle Carboxypeptidase G2 koppelte, als Antikörperenzymkonjugat und Glutamylsenfägas als Prodrug.
65 Senter (USP 4,975,278) beschreibt die Kombination von Antikörperenzymkonjugaten bestehend aus Mausmonoklonalen Antikörpern chemisch verbunden mit alkalischer Phosphatase mit Etoposidphosphat bzw. Penicillin V-amidase und N-(p-hydroxyphenoxyacetyl)adriamycin Prodrugs. Beide Systeme (Bagshawe und Senter) haben den Nachteil, daß die verwendeten Antikörperenzymkonjugate xenogen und damit hoch immunogen sind.

Dadurch ist wahrscheinlich nicht die Möglichkeit gegeben, sie wiederholt am gleichen Patienten im Rahmen mehrerer Therapiezyklen einzusetzen. Zusätzlich besteht im System von Senter der Nachteil, daß das Enzym schon in erheblicher Menge im Humanblut vorkommt, wodurch eine systemische Aktivierung der Prodrug erfolgt.

Aus diesen Unzulänglichkeiten heraus wurde von Bosslet et al. (Br. J. Cancer 65, 234—238, 1992) ein Fusionsprotein, bestehend aus dem humanisierten F(ab')₂ Fragment eines anti CEA Antikörpers und der humanen β -Glucuronidase, hergestellt, welches enzymatisch aktiv ist, Tumorselektivität besitzt, Glucuronyl-drugs spalten kann (Florent et al., Int. Carbohydr. Symposium p. 297, Abstract A262, Paris, 1992; Gesson et al., Int. Carbohydr. Symposium, p. 298, Abstract A263, Paris, 1992; Andrianomenjanahary et al., Int. Carbohydr. Symposium, p. 299, Abstract A264, Paris, 1992) und nach heutigem Stand des Wissens nicht oder nur sehr wenig immunogen ist.

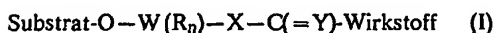
Im Rahmen der Arbeiten zur Synthese und in vivo pharmakologischen Prüfung von Verbindungen, die optimal von diesem Fusionsprotein gespalten werden sollten, haben wir unerwarteter Weise Substanzen gefunden, die in Tumoren mit deutlichem Anteil desintegrierender Zellen, in entzündlichen Prozessen und bei Autoimmunitätskrankungen ohne vorherige Applikation des Fusionsproteins sehr effizient gespalten werden.

Hierbei werden zur Aktivierung der Verbindungen beim gesunden Individuum vornehmlich intrazellulär vorkommende Enzyme genutzt, die unter oben erwähnten pathophysiologischen Bedingungen allerdings lokal extrazellulär vorkommen.

Diese Verbindungen besitzen die allgemeine Formel Substrat-Spacer-Wirkstoff, dadurch gekennzeichnet, daß Substrat und Spacer unter physiologischen oder pathophysiologischen Bedingungen vom Wirkstoff abspaltbar sind. Die Eigenschaften dieser Verbindungen sind derart, daß im allgemeinen das Substrat durch enzymatische Hydrolyse, aber nicht proteolytisch, und danach der Spacer durch chemische Hydrolyse spontan abgespalten wird. Das Substrat ist kein Aminosäure- oder Peptidrest. Der Spacer ist nicht P-amidobenzyl-oxycarbonyl. Wirkstoff bedeutet eine chemische Substanz mit biologischer Wirkung, besonders ein Pharmazeutikum, sowie deren durch Einführung zusätzlicher Hydroxy-, Amino- oder Iminogruppen gewonnenen Derivate, ausgenommen über ein Stickstoffatom gebundene Anthrazykline, Paranitroanilid oder Cytosinarabinosid.

Gegenstand der Erfindung sind solche Verbindungen.

Gegenstand der Erfindung sind besonders Substrat-Spacer-Wirkstoff-Verbindungen der Formel I



worin

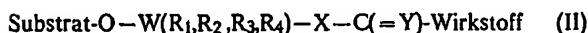
Substrat ein enzymatisch abspaltbares Kohlenhydrat,

W(R_n) ein aromatisches carbocyclisches oder heteroaromatisches System oder aliphatisches System mit konjugierten Doppelbindungen oder eine nach Abspaltung des Substrats zyklisierendes Aminosäurederivat, bei dem die Substituenten R_n unabhängig oder gleich H, Methyl, Methoxy, Carboxy, Methyloxycarbonyl, CN, Hydroxy, Nitro, Fluor, Chlor, Brom, Sulfonyl, Sulfonamid oder Sulfon (C₁₋₄)-alkylamid sind, X O, NH, methylenoxy, methylenamino oder methylen-(C₁₋₄)-alkylamino und

Y O oder NH ist, und

Wirkstoff eine über eine Hydroxy-, Amino- oder Iminogruppe verknüpfte Verbindung mit biologischer Wirkung, beispielhaft ausgewählt aus der Gruppe Etoposide, N-Bis-(2-chlorethyl)-4-hydroxyanilin, 4-Hydroxycyclophosphamid, Doxorubicin, 4'-epi-Doxorubicin, 4- oder 4'-Desoxy-doxorubicin, Vindesin, Vinblastin, Vincristin, Terfenadin, Terbutalin, Fenoterol, Salbutamol, Muscarin, Oxyphenbutazon, Salicylsäure, p-Aminosalicylsäure, 5-Fluorouracil, 5-Fluorouridin, 5-Fluorouridin, Methotrexat, Diclofenac, Flufenaminsäure, 4-Methylaminophenazon, Theophyllin, Nifedipin, Mitomycin C, Mitoxantron, Camptothecin, m-AMSA, Taxol, Nocodaxol, Colchicin, Cyclophosphamid, Rachelmycin, Cisplatin, Melphalan, Bleomycin, Stickstoff-Senfgas, Phosphoramid-Senfgas, Quercetin, Genistein, Erbstatin, Tyrphostin, Rohitukin-Derivat ((-)-cis-5,7-Dihydroxy-2-(2-chlorphenyl)-8-[4-(3-hydroxy-1-methyl)-piperidinyl]-4H-1-benzopyran-4-on; EP 89119710.5), Retinolsäure, Buttersäure, Phorbolster, DMSO, Acclacinomycin, Progesteron, Buserelin, Tamoxifen, Mifepriston, Onapriston, N-(4-amino-butyl)-5-chloro-2-naphtalen-sulfonamid, Pyridinylloxazol-2-on, Quino-Iyl-, Isoguinolyloxazolone-2-on, Staurosporin, Ethanolamin, Verapamil, Forskolin, 1,9-Dideoxyforskolin, Quinin, Quinidin, Lonidamin, Buthioninsulfoximin, Diethyldithiocarbamat, Cyclosporin A, Azathioprin, Chlorambucil, N-(4-Trifluormethyl)-phenyl-2-cyano-3-hydroxy-croton-säureamid (WO 91/17748), 15-Deoxyspergualin, FK 506, Ibuprofen, Indomethacin, Aspirin, Sulfasalazin, Penicillinamin, Chloroguin, Dexamethason, Prednisolon, Lidocain, Propafenon, Procain, Mefonaminsäure, Paracetamol, 4-Aminophenazon, Muskosin, Orciprenalin, Isoprenalin, Amilorid, p-Nitrophenylguanidinobenzoat oder deren durch eine oder mehrere Hydroxy-, Amino- oder Iminogruppen zusätzlich substituierte Derivate bedeutet.

Bevorzugt sind Verbindungen der Formel II,



worin

Substrat ein enzymatisch abspaltbares Kohlenhydrat,

W(R₁, R₂, R₃, R₄) ein Phenylrest oder ein mehrfach substituierter Phenylrest, bei dem die Substituenten R₁, R₂, R₃, R₄ unabhängig oder gleich H, Methyl, Methoxy, Carboxy, Methyloxycarbonyl, CN, Hydroxy, Nitro, Fluor, Chlor, Brom, Sulfonyl, Sulfonamid oder Sulfon (C₁₋₄)-alkylamid sind, X O, NH, methylenoxy, methylenamino oder methylen-(C₁₋₄)-alkylamino, Y O oder NH ist, und

Wirkstoff eine Verbindung wie oben beschrieben bedeutet.

- Besonders bevorzugte Verbindungen sind solche Verbindungen der Formel II, worin Substrat ein alpha- oder beta-O-glycosidisch verknüpfter D-Glucuronyl-, D-Glucopyranosyl-, D-Galactopyranosyl-, N-Acetyl-D-glucosaminyl-, N-Acetyl-D-galactosaminyl-, D-Mannopyranosyl- oder L-Fucopyranosylrest, W(R₁,R₂,R₃,R₄) ein Phenylrest oder ein monosubstituierter Phenylrest, bei dem einer der Substituenten R₁, R₂, R₃ oder R₄ Methoxy, Methyloxy, Carbonyl, CN, Hydroxy, Nitro, Fluor, Chlor, Brom, Sulfonyl oder Sulfonamid ist und die übrigen Wasserstoff sind, X O, NH, methylenoxy, methylenamino oder methylen-methylamino und Y O oder NH ist und Wirkstoff eine Verbindung wie oben beschrieben bedeutet.
- 10 Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind die folgenden:
- Verbindung, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat durch enzymatische Hydrolyse, aber nicht proteolytisch abgespalten werden kann, daß der Spacer durch chemische Hydrolyse spontan abgespalten werden kann, daß der Wirkstoff ein Pharmazeutikum oder eines seiner durch Einführung zusätzlicher Hydroxy-, Amino- oder Iminogruppen erhaltenen Derivate ist, daß sie hydrophiler ist als der Wirkstoff, daß sie in vivo zu weniger toxischen Reaktionen führt als der Wirkstoff als solcher, daß der Wirkstoff eine pharmakologisch wirksame Substanz ist, daß der Wirkstoff durch eine oder mehrere Hydroxy-, Amino- oder Iminogruppe zusätzlich substituiert ist und das Tumorstadium verlangsamt, daß der Wirkstoff ein Standardzytostatikum ist, daß der Wirkstoff ein Antimetabolit ist, daß der Wirkstoff 5-Fluorouracil, 5-Fluorocytidin, 5-Fluorouridin, Cytosinarabinosid oder Methotrexat ist, daß der Wirkstoff eine in die DNA interkalierende Substanz ist, daß der Wirkstoff Doxorubicin, Daunomycin, Idarubicin, Epirubicin oder Mitoxantron ist, daß der Wirkstoff die Topoisomerase I + II hemmt, daß der Wirkstoff Camptothecin, Etoposid oder M-AMSA ist, daß der Wirkstoff ein Tubulinhemmer ist, daß der Wirkstoff Vincristin, Vinblastin, Vindesin, Taxol, Nocodaxol, Colchicin oder Etoposid ist, daß der Wirkstoff ein Alkylant ist, daß der Wirkstoff Cyclophosphamid, Mitomycin C, Rachelemycin, Cisplatin, Phosphoramide-Senfgas, Melphalan, Bleomycin, Stickstoff-Senfgas oder N-Bis-(2-chlorethyl-4-hydroxyanilin) ist, daß der Wirkstoff Neocarzinostatin, Calicheamicin, Dymecicin oder Esperamicin A ist, daß der Wirkstoff eine die Ribosomen inaktivierende Verbindung ist, daß der Wirkstoff Verrucarin A ist, daß der Wirkstoff ein Tyrosinphosphokinaseinhibitor ist, daß der Wirkstoff Quercetin, Genistein, Erbstatin, Tyrphostin oder Rohitukin-Derivat ist, daß der Wirkstoff ein Differenzierungsinduktor ist, daß der Wirkstoff Retinolsäure, Buttersäure, Phorbol-ester, DMSO oder Aclacinomycin ist, daß der Wirkstoff ein Hormon, Hormonagonist bzw. Hormonantagonist ist, daß der Wirkstoff Progesteron, Buserelin, Tamoxifen, Mifepriston oder Onapriston ist, daß der Wirkstoff eine Substanz ist, welche die pleiotrope Resistenz gegenüber Zytostatika verändert, daß der Wirkstoff ein Calmodulin-Inhibitor ist, daß der Wirkstoff ein Proteinkinase C-Inhibitor ist, daß der Wirkstoff ein P-Glykoprotein-Inhibitor ist, daß der Wirkstoff ein Modulator der mitochondrial gebundenen Hexokinase ist, daß der Wirkstoff ein Inhibitor der gamma-Glutamylcysteinsynthetase oder der Glutathion-S-transferase ist, daß der Wirkstoff ein Inhibitor der Superoxiddismutase ist, daß der Wirkstoff einen Inhibitor des durch den MAk Ki67 definierten proliferationsassoziierten Proteins im Zellkern sich teilender Zellen darstellt, daß der Wirkstoff eine Substanz ist, die immunsuppressive Effekte ausübt, daß der Wirkstoff ein Standardimmunsuppressivum ist, daß der Wirkstoff ein Makrolid ist, daß der Wirkstoff Cyclosporin A, Rapamycin, FK 506 ist, daß der Wirkstoff Azathioprin, Methotrexat, Cyclophosphamid oder Chlorambucil ist, daß der Wirkstoff eine Substanz ist, die antiinflammatorische Wirkung hat, daß der Wirkstoff eine nicht steroidale antiinflammatorische Substanz ist, daß der Wirkstoff eine slow acting anti-rheumatic drug ist, daß der Wirkstoff ein Steroid darstellt, daß der Wirkstoff eine Substanz ist, die antiphlogistische, analgetische oder antipyretische Wirkung hat, daß der Wirkstoff ein Derivat einer organischen Säure darstellt, daß der Wirkstoff ein nicht saures Analgetikum / Antiphlogistikum darstellt, daß der Wirkstoff Oxyphenbutazon ist, daß der Wirkstoff ein Lokalanästhetikum ist, daß der Wirkstoff ein Antiarrhythmikum ist, daß der Wirkstoff ein Ca⁺⁺ Antagonist ist, daß der Wirkstoff ein Antihistaminikum ist, daß der Wirkstoff ein Hemmstoff der Phosphodiesterase ist, daß der Wirkstoff ein Parasympathomimetikum ist, daß der Wirkstoff ein Sympathomimetikum ist oder daß der Wirkstoff eine Substanz mit inhibitorischer Wirkung auf die humane Urokinase ist; und außerdem Verbindung, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat ein alpha- oder beta-O-glycosidisch verknüpfter D-Glucuronyl-, D-Glucopyranosyl-, D-Galactopyranosyl-, N-Acetyl-D-glucosaminyl-, N-Acetyl-D-galactosaminyl-, D-Mannopyranosyl- oder L-Fucopyranosylrest ist, daß sie
- 4'-O-[4-(alpha-D-Glucopyranosyloxy)-phenylaminocarbonyl]-etoposid, 4'-O-4-[beta-D-Glucopyranosyloxy)-phenylaminocarbonyl]-etoposid, 4'-O-[4-(alpha-D-Galactopyranosyloxy)-phenylaminocarbonyl]-etoposid,
- 4'-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-phenylaminocarbonyl]-etoposid,
- 4'-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-3-nitro-benzylaminocarbonyl]-etoposid,
- 4'-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-3-chlor-benzylaminocarbonyl]-etoposid,
- 1-N-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzyloxy-carbonyl]-mitomycin C,
- 14-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-3-nitro-benzylaminocarbonyl]-doxorubicin,
- 4-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-4-hydroxy-1-N-(bis-2-chlorethyl)-anilin,
- 4-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-terfenadin,
- 3'-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-terbutalin,
- 3'-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-fenoterol, 1''-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-salbutamol,
- 3-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-muscarin, 4'-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-oxyphenbutazon,
- 2-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-salicylsäure,
- N-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzyloxy-carbonyl]-diclofenac,

N-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzyloxycarbon yl]-flufenaminsäure,
 4-N-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzyloxycarbonyl]-4-methyl-aminophenazon,
 7-N-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzyloxycarbonyl]-theophyllin,
 1-N-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzyloxycarbonyl]-nifedipin oder
 [4-(beta-D-glucuronyloxy)-3-nitrobenzyl]-2-[1-cyano-1-(N-4-trifluormethylphenyl)-carbamoylpropen-1-yl]-carbo-
 nat ist. 5

Diese Verbindungen können in eine geeignete galenische Darreichungsform gebracht werden und als Arzneimittel gebraucht werden.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung einer Glycosidase-spaltbaren Verbindung nach Formel II, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Phenyl-glycosid der Formel III, 10



worin

Substrat ein alpha- oder beta-O-glycosidisch verknüpfter 6-O-Metyl-D-glucuronyl-, D-Glucopyranosyl-, D-Galactopyranosyl-, N-Acetyl-D-glucosaminyl-, N-Acetyl-D-galactosaminyl-, D-Mannopyranosyl- oder L-Fucopyranosylrest, dessen Hydroxygruppen frei oder mittels Acetyl- oder Mono-, Di- oder Trihalogenacetyl-Schutzgruppen mit Halogen Fluor oder Chlor oder Benzylschutzgruppen geschützt sind, 15
 $\text{W}(\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4)$ ein Phenylrest oder ein mono- oder mehrfach substituierter Phenylrest mit Substituenten $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4$ gleich oder unterschiedlich H, Methyl, Methoxy, Carboxy, Methyloxycarbonyl, CN, Hydroxy, Nitro, Fluor, Chlor, Brom, Sulfonyl, Sulfonamid oder Sulfon (C_1-4)-alkylamid, 20
 X O, NH, methylenoxy, methylenamino oder methylen-(C_1-4)-alkylamino,
 Y O oder NH und

Z eine reaktive Abgangsgruppe ausgewählt aus der Gruppe Chlorid, Bromid, Azid oder N-Succinimid-oxy ist, mit einer Wirkstoff-Verbindung vorzugsweise aus der Gruppe 2'',3''-Di-O-chloracetyl-etoposide, N-Bis-(2-chlorethyl)-4-hydroxyanilin, 4-Hydroxy-cyclophosphamid, 3'-N-Fluorenylmethyloxycarbonyl-geschützte Anthracycline Doxorubicin, 4'-epi-Doxorubicin, 4- oder oder 4'-Desoxy-doxorubicin, Vindesin, Vinblastin, Vincristin, 5-Fluorouracil, 5-Fluorocytidin, 5-Fluorouridin, Methotrexat oder Mitomycin C über eine reaktive Hydroxy-, Amino- oder Iminogruppe in Gegenwart einer organischen Base ausgewählt aus der Gruppe Triethylamin, Diisopropylethylamin oder Dimethylaminopyridin und einem Lösungsmittel ausgewählt aus der Gruppe Acetonitril, Dioxan, Tetrahydrofuran, Dichlormethan oder Dichlorethan zu einer geschützten Zwischenverbindung 30
 umgesetzt und anschließend die Schutzgruppen hydrolytisch mit Alkalilauge, Alkalicarbonat, Alkalicyanid, Bariumoxid, Piperidin oder Morpholin in Gegenwart von Methanol, Ethanol oder Wasser abspaltet, wobei eine Verbindung der Formel II entsteht,

worin

Substrat ein alpha- oder beta-O-glycosidisch verknüpfter D-Glucuronyl-, D-Glucopyranosyl-, D-Galactopyranosyl-, N-Acetyl-D-glucosaminyl-, N-Acetyl-D-galactosaminyl-, D-Mannopyranosyl- oder L-Fucopyranosylrest, 35
 $\text{W}(\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4)$ ein Phenylrest oder ein mono- oder mehrfach substituierter Phenylrest mit Substituenten $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4$ gleich oder unterschiedlich H, Methyl, Methoxy, Carboxy, Methyloxycarbonyl, CN, Hydroxy, Nitro, Fluor, Chlor, Brom, Sulfonyl, Sulfonamid oder Sulfon (C_1-4)-alkylamid, 40
 X O, NH, methylenoxy, methylenamino oder methylen-(C_1-4)-alkylamino,
 Y O oder NH und

Wirkstoff eine über eine Hydroxygruppe verknüpfte pharmakologisch wirksame Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe Etoposide, N-Bis-(2-chlorethyl)-4-hydroxyanilin, 4-Hydroxy-cyclophosphamid, Doxorubicin, 4'-epi-Doxorubicin, 4- oder 4'-Desoxy-doxorubicin, Vindesin, Vinblastin oder Vincristin oder eine über Amino- oder Iminogruppe verknüpfte pharmakologisch wirksame Verbindung ausgewählt aus der Gruppe 5-Fluorouracil, Methotrexat oder Mitomycin C bedeuten. 45

Die pharmakologische Wirksamkeit von erfindungsgemäßen Substrat-Spacer-Wirkstoff-Verbindungen (im folgenden Prodrug genannt) wurde in vivo in relevanten tiereperimentellen Systemen getestet. Für die onkologische Indikation wurde ein Modell ausgewählt, in dem humane Tumore subkutan auf nackte Mäuse transplantiert werden und die erfindungsgemäßen Prodrugs nach Etablierung des Tumors i. v. appliziert werden. 50

Die Ergebnisse (Beispiele 23-25 mit Tabellen) zeigen, daß die erfindungsgemäßen Prodrugs bei Tumoren mit signifikantem desintegrierendem Tumorzellanteil wesentlich wirksamer sind als die Standardchemotherapie, durchgeführt mit der maximal verträglichen Dosis an Drug. Hierbei ist es unbedeutend, ob die Desintegration eines signifikanten Tumorzellanteils durch die Tumorgroße und die daraus resultierende mangelhafte Ernährung von Teilen des Tumors (zentrale Nekrose) bewirkt wird oder durch eine exogen zugeführte Substanz (Immuntoxin, Bestrahlung, Fusionsprotein als überlegene Ausführungsform eines Antikörperenzymkonjugates, Fusionsprotein aus einer Binderegion und der DNase 1, z. B. scFVDNaseI, Zytostatikum, etc.) in einem vorhergehenden, parallel ablaufenden, oder danach eingesetzten Behandlungsschritt induziert wird. Die überlegene pharmakologische Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Prodrugs ist durch folgende Eigenschaften bedingt: 60

- a) Die Prodrugs sind in vivo signifikant ($> 70 \times$) weniger toxisch als die in der Prodrug enthaltenen Standarddrugs.
- b) Die in vivo am Ort der Aktivierung (Tumor) aus der Prodrug freigesetzte zytotoxische Drugmenge ist unter obigen experimentellen Bedingungen $5-50 \times$ höher als die durch i.v. Standardtherapie im Tumor erreichbare Drugmenge. 65
- c) Die in Normalgeweben unspezifisch aus der Prodrug freigesetzte Drugmenge bzw. durch potentielle Ausschwämmung von der am Tumor erzeugten Drug bedingte Drugkonzentration in den Normalgeweben

liegt deutlich unter den Konzentrationen der Normalgewebedrug, die durch Applikation von Standard-drugs nach i.v. Gabe erreicht werden. Diese Beobachtung untermauert die Daten, welche die drastisch reduzierte in vivo Toxizität der Prodrug gegenüber der Drug belegen (a).

- 5 d) Plasmapharmakokinetische Untersuchungen sowie Urinanalysen zeigen, daß die erfindungsgemäßen Prodrugs in gesunden Tieren sehr schnell ($t_{1/2} \approx 12$ min) hauptsächlich über die Nieren als ungespaltene Prodrugs ausgeschieden werden.

Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß die erfindungsgemäßen Prodrugs eine ausreichende Hydrophilie besitzen, die eine hauptsächlich extrazelluläre Verteilung in vivo bedingt.

- 10 Da der Substratanteil der erfindungsgemäßen Prodrugs so gewählt ist, daß er nur von unter pathophysiologischen Bedingungen lokal freigesetzten Enzymen abspaltbar ist, kann die lipophile Drug ebenfalls nur am Zielgewebe freigesetzt werden und dort ihre zytotoxische Wirkung entfalten.

- Steigern läßt sich die überlegene Wirkung einer erfindungsgemäßen Prodrug mit zytotoxischer Drugkomponente dadurch, daß sie mit erfindungsgemäßen Prodrugs mit einer anderen zytotoxischen Drugkomponente kombiniert wird. Hierbei sind Prodrugkombinationen von Vorteil, bei denen zytotoxische Komponenten mit unterschiedlichem Wirkmechanismus verwendet werden, entsprechend der Poly-Chemotherapie. Besonders geeignet erscheint der Einsatz von Wirkstoffen, die sehr effizient Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche in der DNA hervorrufen wie Calicheamicin. Von besonderem Vorteil sind allerdings erfindungsgemäße Prodrugkombinationen, bei denen eine Drug zytotoxisches Potential hat, eine andere aber z. B. die Multi-Drug-Resistenz blockiert. Besonders geeignet sind in diesem Zusammenhang erfindungsgemäße Prodrugs, deren Drugkomponente die Multi-Drug-Resistenz dadurch beeinflußt, daß sie die Tyrosinphosphokinase inhibiert, die Differenzierung induziert, Hormon- bzw. Hormonantagonistische Wirkung zeigt, ein Calmodulin-Inhibitor ist, ein Proteinkinase C-Inhibitor ist, ein P-Glykoproteininhibitor ist, ein Ionenkanalblocker ist, die mitochondriale Hexokinase inhibiert, die gamma-Glutamylcysteinsynthetase, die Glutathion-S-transferase sowie die Superoxid-dismutase inhibiert. Weitere interessante Wirkstoffe zur Beeinflussung des Tumorwachstums sind Verbindungen, die das von Gerdes et al. (Amer. J. Pathol. 138, 867—873, 1991) beschriebene proliferationsinduzierte Protein funktionell blockieren. Besonders als Wirkstoffkomponente in den erfindungsgemäßen Substrat-Spacer-Wirkstoff-Verbindungen sollte sich die Effizienz dieser Wirkstoffe nach lokaler enzymatischer Aktivierung besonders selektiv nutzen lassen.

- 30 Besonders günstige therapeutische Effekte werden erzielt, wenn z. B. eine Glucuronyl-Spacer-Verapamil Prodrug kombiniert mit einer Glucuronyl-Spacer-Doxorubicin Prodrug (siehe Tabelle 1) eingesetzt wird. Analytische Untersuchungen ergaben, daß in einer solchen Kombination die Verapamilderivatkonzentration im Tumor ähnlich stark erhöht ist im Vergleich zu konventioneller Verapamilbehandlung wie die zytostatische Drugkonzentration im Vergleich zu konventioneller Zytostatikatherapie.

- 35 Für die pharmakologische Prüfung erfindungsgemäßer Prodrugs, die für nicht onkologische Erkrankungen geeignet sind, wurden folgende tierexperimentelle Systeme ausgewählt:

- a) Granuloma pouch Modell in der Maus:
Bottomley et al., Brit. J. Pharmacol. 93, 627—635 (1988)
40 b) Adjuvansarthritis in der Ratte
Schorlemmer et al., Exptl. Clin. Res. XVII (10/11) 471—483 (1991)
c) DTH-Modell in der Maus
Dickneite et al., Infect. Immun. 44 (1), 1683-174 (1984)
d) Dextransulfat-induzierte Colitis in der Maus
45 Okayasu et al., Gastroenterology 98, 6943-702 (1990)
e) EAE-Modell
Schorlemmer et al., Drugs Exptl. Clin. Res. XVII (10/11) 461—469 (1991)
f) MRL-1 Modell
Schorlemmer et al., Int. J. Immunother. VII (4) 169—180 (1991).

- 50 In diesen Modellen wurde die Wirksamkeit, vor allem der in Beispiel 22 näher beschriebenen Prodrug-Verbindung 22 untersucht. Überlegene Wirksamkeit der Prodrug gegenüber dem Wirkstoff (Hydroxycrotonsäureamid-Derivat 2) selbst in dieser Verbindung wurde vor allem bei der Adjuvansarthritis und der EAE festgestellt. Ähnlich wie in den vorhergehenden Untersuchungen in der onkologischen Indikation war die überlegene
55 Wirksamkeit mit höheren Wirkstoffkonzentrationen vor allem in der Synovialflüssigkeit verbunden (Adjuvansarthritis).

- Diese Beobachtungen in den oben erwähnten nicht onkologischen Modellen legen die generelle Verwendbarkeit der erfindungsgemäßen Prodrugs nahe. Als Drugkomponente kommen alle Substanzen in Frage, deren therapeutischer Einsatz mit unangenehmen Nebenwirkungen verbunden ist, bzw. deren Wirkkonzentration in vivo nur grenzwertig erreicht wird. Hierzu zählen neben dem bereits in Prodrugform verwendeten immunsuppressiven Wirkstoff aus Beispiel 22 weitere Immunsuppressiva (Azathioprin, Methotrexat, Cyclophosphamid, Chlorambucil, 15-Deoxyspergualin, Cyclosporin A, FK 506 etc.), nicht steroidale antiinflammatorische Drugs (NSAIDs; Bsp.: Ibuprofen, Indomethacin, Aspirin etc.), slow acting anti-rheumatic drugs (SAADRs; Bsp.: Sulfasalazin, Penicillinamin, Chloroguin) und Steroide (Bsp.: Dexamethason, Prednisolon, etc.). Des weiteren eignen sich
65 die im folgenden beispielhaft erwähnten Substanzen mit antiphlogistischer, analgetischer und antipyretischer Wirkung als Drugbaustein in den erfindungsgemäßen Prodrugs.

Beispiele für Substanzen mit antiphlogistischer analgetischer und antipyretischer Wirkung:

1. Derivate organischer Säuren:

- Salicylsäure
- p. Aminosalicylsäure
- Diclofenac
- Flufenaminsäure
- Mefenaminsäure

5

2. Nicht saure Analgetika/Antiphlogistika

- Paracetamol
- Pyrazolon-Derivate (z. B. 4-Aminophenazon; 4-Methylaminophenazon)

10

3. Oxyphenbutazon.

Weitere Drugs, die sich als Baustein für die erfindungsgemäßen Prodrugs eignen, sind die Ca^{++} -Antagonisten (Bsp.: Nifedipin, Indikation: entzündliche Erkrankungen), die Antihistaminika (Bsp.: Terfenadin, Indikation: Allergie, Asthma, entzündliche Erkrankungen), Hemmstoffe der Phosphodiesterase (Bsp.: Theophyllin, Indikation: Asthma, Allergie, entzündliche — Erkrankungen), Parasympathomimetika (Bsp.: Muskarin, Indikation: Autoimmunerkrankungen) sowie Sympathomimetika (Bsp.: Terbutalin, Fenoterol, Sulbutamol, Orciprenalin, Isoprenalin, Indikation: Asthma).

15

Eine als Wirkstoff für die erfindungsgemäßen Prodrugs besonders geeignete Substanzklasse stellen die synthetischen Urokinaseinhibitoren dar (wie z. B. p-Nitrophenylguanidinobenzoat, Amilorid etc.), die vorzugsweise bei der Behandlung entzündlicher Erkrankungen in Prodrugform zukünftig Verwendung finden könnten.

20

Zusammenfassend soll hier nochmals betont werden, daß die oben erwähnten Drugs bzw. die hieraus erfindungsgemäß herstellbaren Prodrugs nur Beispiele darstellen. Die erfindungsgemäßen Prodrugs lassen sich bei allen nicht onkologischen Erkrankungen einsetzen, bei denen Makrophagen, Granulozyten und Thrombozyten, insbesondere in aktiviertem Zustand vorkommen. In aktiviertem Zustand scheiden die oben erwähnten Zellen vornehmlich intrazelluläre Enzyme aus, die eine ortsspezifische Aktivierung der erfindungsgemäßen Prodrugs ermöglicht.

25

In der onkologischen Indikation erfolgt die Aktivierung der erfindungsgemäßen Prodrugs durch aus sterbenden Tumorzellen freigesetzte intrazelluläre Enzyme. Diese Phänomen tritt vor allem bei größeren Tumoren auf (> 0.3 cm), aber auch nach Schädigung des Tumors durch Behandlung mit Immuntoxinen, Zytostatika, Bestrahlung, Fusionsproteinen, Antikörperenzymkonjugaten etc. Des weiteren kann ein Beitrag zur Prodrugaktivierung von im Tumor vorhandenen aktivierten Zellen (vor allem von Makrophagen, Granulozyten etc.) nicht ausgeschlossen werden.

30

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

35

Beispiel 1

4'-O-[4-(alpha-D-Glucopyranosyloxy)-phenylaminocarbonyl]-etoposid (Verbindung 1)

40

500 mg (0.68 mmol) 2''3''-Di-O-chloracetyl-etoposid wurde in 50 ml DMF gelöst und mit 0.34 ml (3 äq) Diisopropylethylamin und 0.12 ml (1.5 äq) Diphosgen bei Raumtemperatur versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 h gerührt und anschließend mit 0.22 ml Diisopropylethylamin und 250 mg (0.9 mmol)

4-(alpha-D-Glucopyranosyloxy)-anilin gelöst in 50 ml DMF versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 14 h bei Raumtemperatur gerührt, dann mit Ethylacetat versetzt und dreimal mit Citratpuffer (pH 5) ausgewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und in vacuo eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (50 g) mit Chloroform und Methanol 6 : 1 gereinigt. Es wurden 438 mg 4'-O-[4-(alpha-D-Glucopyranosyloxy)-phenylaminocarbonyl]-2''3''-di-O-chloracetyl-etoposid erhalten. Dünnschichtchromatographische Analyse: $R_f = 0.6$ in Chloroform und Methanol 3 : 1.

45

Das erhaltene Konjugat (400 mg) wurde in 80 ml Methanol gelöst und mit 3.0 g Ionenaustauscher Dowex 1 x 8 versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt und das Harz wurde abfiltriert und nachgewaschen. Das Filtrat wurde in vacuo eingedampft. Der Rückstand wurde über Kieselgel (50 g) mit Chloroform, Methanol und Eisessig 5 : 2 : 2 gereinigt. Es wurden 256 mg Titelverbindung erhalten. Dünnschichtchromatographische Analyse: $R_f = 0.46$ in Chloroform, Methanol und Eisessig 5 : 2 : 2.

50

55

Beispiel 2

4'-O-[4-(beta-D-Glucopyranosyloxy)-phenylaminocarbonyl]-etoposid (Verbindung 2)

60

500 mg (0.68 mmol) 2''3''-Di-O-chloracetyl-etoposid wurde in 50 ml DMF gelöst und mit 0.34 ml (3 äq) Diisopropylethylamin und 0.12 ml (1.5 äq) Diphosgen bei Raumtemperatur versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 h gerührt und anschließend mit 0.22 ml Diisopropylethylamin und 250 mg (0.9 mmol) 4-(beta-D-Glucopyranosyloxy)-anilin gelöst in 50 ml DMF versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 14 h bei Raumtemperatur gerührt, dann mit Ethylacetat versetzt und dreimal mit Citratpuffer (pH 5) ausgewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und in vacuo eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (50 g) mit Chloroform und Methanol 6 : 1 gereinigt. Es wurden 450 mg 4'-O-[4-(beta-D-Glucopyranosyloxy)-phenylaminocarbonyl]-2''3''-di-O-chloracetyl-etoposid erhalten. Dünnschichtchromato-

65

graphische Analyse: $R_f = 0.56$ in Chloroform und Methanol 3 : 1.

Das erhaltene Konjugat (400 mg) wurde in 80 ml Methanol mit 3.0 g Ionenaustauscher Dowex 1 x 8 entblockiert, wie im Beispiel 1 beschrieben. Es wurden 270 mg Titelverbindung erhalten. Dünnschichtchromatographische Analyse: $R_f = 0.44$ in Chloroform, Methanol und Eisessig 5 : 2 : 2.

5

Beispiel 3

4'-O-[4-(alpha-D-Galactopyranosyloxy)-phenylaminocarbonyl]-etoposid (Verbindung 3)

10 500 mg (0.68 mmol) 2'',3''-Di-O-chloracetyl-etoposid wurde in 50 ml DMF gelöst und mit 0.34 ml (3 äq) Diisopropylethylamin und 0.12 ml (1.5 äq) Diphosgen bei Raumtemperatur versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 h gerührt und anschließend mit 0.22 ml Diisopropylethylamin und 250 mg (0.9 mmol) 4-(alpha-D-Galactopyranosyloxy)-anilin gelöst in 50 ml DMF versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 14 h bei Raumtemperatur gerührt, dann mit Ethylacetat versetzt und dreimal mit Citratpuffer (pH 5) ausgewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und in vacuo eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (50 g) mit Chloroform und Methanol 6 : 1 gereinigt. Es wurden 460 mg 4'-O-[4-(alpha-D-Galactopyranosyloxy)-phenylaminocarbonyl]-2'',3''-di-O-chloracetyl-etoposid erhalten. Dünnschichtchromatographische Analyse: $R_f = 0.46$ in Chloroform und Methanol 3 : 1.

20 Das erhaltene Konjugat (420 mg) wurde in 80 ml Methanol mit 3.0 g Ionenaustauscher Dowex 1 x 8 entblockiert, wie im Beispiel 1 beschrieben. Es wurden 250 mg Titelverbindung erhalten. Dünnschichtchromatographische Analyse: $R_f = 0.41$ in Chloroform, Methanol und Eisessig 5 : 2 : 2.

Beispiel 4

25 4'-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-phenylaminocarbonyl]-etoposid (Verbindung 4)

500 mg (0.68 mmol) 2'',3''-Di-O-chloracetyl-etoposid wurde in 50 ml DMF gelöst und mit 0.34 ml (3 äq) Diisopropylethylamin und 0.12 ml (1.5 äq) Diphosgen bei Raumtemperatur versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 h gerührt und anschließend mit 0.22 ml Diisopropylethylamin und 250 mg (0.86 mmol) 4-(6-O-Methyl-beta-D-glucuronyloxy)-anilin gelöst in 50 ml DMF versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 14 h bei Raumtemperatur gerührt, dann mit Ethylacetat versetzt und dreimal mit Citratpuffer (pH 5) ausgewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und in vacuo eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (50 g) mit Chloroform und Methanol 6 : 1 gereinigt. Es wurden 460 mg 4'-O-[4-(6-O-Methyl-beta-D-glucuronyloxy)-phenylaminocarbonyl]-2'',3''-di-O-chloracetyl-etoposid erhalten. Dünnschichtchromatographische Analyse: $R_f = 0.63$ in Chloroform und Methanol 3 : 1.

35 Das erhaltene Konjugat (400 mg) wurde in 80 ml Methanol mit 2.0 g Bariumoxid entblockiert. Es wurden 280 mg Titelverbindung erhalten. Dünnschichtchromatographische Analyse: $R_f = 0.24$ in Chloroform, Methanol und Eisessig 5 : 2 : 2.

40

Beispiel 5

4'-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-3-nitro-benzylaminocarbonyl]-etoposid (Verbindung 5)

500 mg (0.68 mmol) 2'',3''-Di-O-chloracetyl-etoposid wurde in 50 ml DMF gelöst und mit 0.34 ml (3 äq) Diisopropylethylamin und 0.12 ml (1.5 äq) Diphosgen bei Raumtemperatur versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 h gerührt und anschließend mit 0.22 ml Diisopropylethylamin und 250 mg (0.80 mmol) 4-(6-O-Methyl-beta-D-glucuronyloxy)-3-nitro-benzylamin gelöst in 50 ml DMF versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 14 h bei Raumtemperatur gerührt, dann mit Ethylacetat versetzt und dreimal mit Citratpuffer (pH 5) ausgewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und in vacuo eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (50 g) mit Chloroform und Methanol 6 : 1 gereinigt. Es wurden 456 mg 4'-O-[4-(6-O-Methyl-beta-D-glucuronyloxy)-3-nitro-benzyl-aminocarbonyl]-2'',3''-di-O-chloracetyl-etoposid erhalten. Dünnschichtchromatographische Analyse: $R_f = 0.64$ in Chloroform und Methanol 3 : 1.

50 Das erhaltene Konjugat (400 mg) wurde in 80 ml Methanol mit 2.0 g Bariumoxid entblockiert. Es wurden 320 mg Titelverbindung erhalten. Dünnschichtchromatographische Analyse: $R_f = 0.27$ in Chloroform, Methanol und Eisessig 5 : 2 : 2.

55

Beispiel 6

4'-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-3-chlor-benzylaminocarbonyl]-etoposid (Verbindung 5)

60 500 mg (0.68 mmol) 2'',3''-Di-O-chloracetyl-etoposid wurde in 50 ml DMF gelöst und mit 0.34 ml (3 äq) Diisopropylethylamin und 0.12 ml (1.5 äq) Diphosgen bei Raumtemperatur versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 h gerührt und anschließend mit 0.22 ml Diisopropylethylamin und 250 mg (0.80 mmol) 4-(6-O-Methyl-beta-D-glucuronyloxy)-3-chlor-benzylamin gelöst in 50 ml DMF versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 14 h bei Raumtemperatur gerührt, dann mit Ethylacetat versetzt und dreimal mit Citratpuffer (pH 5) ausgewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und in vacuo eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (50 g) mit Chloroform und Methanol 6 : 1 gereinigt. Es wurden 430 mg 4'-O-[4-(6-O-Methyl-beta-D-glucuronyloxy)-3-chlor-benzyl-aminocarbonyl]-2'',3''-di-O-chloracetyl-etoposid

65

erhalten. Dünnschichtchromatographische Analyse: $R_f = 0.68$ in Chloroform und Methanol 3 : 1.

Das erhaltene Konjugat (400 mg) wurde in 80 ml Methanol mit 2.0 g Bariumoxid entblockiert. Es wurden 340 mg Titelverbindung erhalten. Dünnschichtchromatographische Analyse: $R_f = 0.29$ in Chloroform, Methanol und Eisessig 5 : 2 : 2.

Beispiel 7

1-N-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzyloxycarbonyl]-mitomycin C (Verbindung 7)

500 mg (1.13 mmol) 4-(6-Methyl-2,3,4-tri-O-acetyl-beta-D-glucuronyloxy)-benzyl-alkohol wurden in 20 ml Toluol gelöst und mit 440 mg (3 äq) Diisopropylethylamin und 315 mg (1.5 äq) Diphosgen versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 680 mg (1.8 äq) Mitomycin C und 290 mg (2 äq) Diisopropylethylamin gelöst in 50 ml DMF zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 14 h gerührt, dann mit Ethylacetat versetzt und mit Citratpuffer ausgewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und in vacuo eingedampft. Rohausbeute: 651 mg (72%). Das Konjugat (600 mg) wurde in 30 ml Chloroform und Methanol 2 : 1 gelöst und mit 250 mg Bariumoxid versetzt. Nach 4 h Rühren wurde der Ansatz abfiltriert und das Filtrat wurde eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Sephadex mit Methanol und Wasser gereinigt. Ausbeute der Titelverbindung: 335 mg (75%).

Beispiel 8

14-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-3-nitro-benzylaminocarbonyl]-doxorubicin (Verbindung 8)

400 mg (0.52 mmol) 3'-N-Fluorenylmethyloxycarbonyl-doxorubicin wurden in 20 ml Toluol gelöst und mit 200 mg (3 äq) Diisopropylethylamin und 144 mg (1.5 äq) Diphosgen versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und mit 294 mg (1.8 äq) 4-(6-O-Methyl-beta-D-glucuronyloxy)-3-nitrobenzylamin und 134 mg (2 äq) Diisopropylethylamin gelöst in 50 ml DMF versetzt. Die Mischung wurde 14 h gerührt, dann mit Ethylacetat versetzt und mit Citratpuffer (pH 5) ausgewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und in vacuo eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt. Ausbeute: 370 mg (65%). Die geschützte Zwischenverbindung (300 mg) wurde in 20 ml THF gelöst und mit 1.0 ml Piperidin versetzt. Nach 14 h Rühren wurde der Ansatz in vacuo eingedampft und mit Toluol codestilliert. Der Rückstand wurde in 20 ml Methanol gelöst und mit 250 mg Bariumoxid versetzt. Nach 5 h Rühren wurde die Reaktionsmischung abfiltriert und das Filtrat wurde in vacuo eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Sephadex mit Methanol und Wasser gereinigt. Ausbeute der Titelverbindung: 140 mg (56%).

Beispiel 9

4-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-4-hydroxy-1-N-(bis-2-chlorethyl)-anilin (Verbindung 9)

400 mg (171 mmol) 4-Hydroxy-1-N-(bis-2-chlorethyl)-anilin wurden in 20 ml Toluol gelöst und mit 950 mg Diisopropylethylamin und 500 mg (1.5 äq) Diphosgen versetzt. Nach 1 h Rühren wurden zu der Reaktionsmischung 960 mg (1.8 äq) 4-(6-O-Methyl-beta-D-glucuronyloxy)-benzylamin und 0.63 ml Diisopropylethylamin gelöst in 50 ml DMF zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 14 gerührt, dann mit Ethylacetat versetzt und mit Citratpuffer ausgewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und in vacuo eingedampft. Der Rückstand (550 mg) wurde in Methanol gelöst und mit 400 mg Bariumoxid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 4 h gerührt, abfiltriert und in vacuo eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Sephadex gereinigt. Ausbeute der Titelverbindung: 420 mg.

Beispiel 10

4-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-terfenadin (Verbindung 10)

Ausgehend von Terfenadin und 4-(6-O-Methyl-beta-D-glucuronyloxy)-benzylamin wurde die Titelverbindung, wie im Beispiel 9 beschrieben, hergestellt.

Beispiel 11

3'-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-terbutalin (Verbindung 11)

Ausgehend von Terbutalin und 4-(6-O-Methyl-beta-D-glucuronyloxy)-benzylamin wurde die Titelverbindung, wie im Beispiel 9 beschrieben, hergestellt.

Beispiel 12

3'-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-fenoterol (Verbindung 12)

Ausgehend von Fenoterol und 4-(6-O-Methyl-beta-D-glucuronyloxy)-benzylamin wurde die Titelverbindung,

wie im Beispiel 9 beschrieben, hergestellt.

Beispiel 13

5 1''-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-salbutamol (Verbindung 13)

Ausgehend von Salbutamol und 4-(6-O-Methyl-beta-D-glucuronyloxy)-benzylamin wurde die Titelverbindung, wie im Beispiel 9 beschrieben, hergestellt.

10 Beispiel 14

3-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-muscarin (Verbindung 14)

15 Ausgehend von Muscarin und 4-(6-O-Methyl-beta-D-glucuronyloxy)-benzylamin wurde die Titelverbindung, wie im Beispiel 9 beschrieben, hergestellt.

Beispiel 15

20 4'-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-oxyphenbutazon (Verbindung 15)

Ausgehend von Oxyphenbutazon und 4-(6-O-Methyl-beta-D-glucuronyloxy)-benzylamin wurde die Titelverbindung, wie im Beispiel 9 beschrieben, hergestellt.

Beispiel 16

25 2-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-salicylsäure (Verbindung 16)

Ausgehend von Salicylsäuremethylester und 4-(6-O-Methyl-beta-D-glucuronyloxy)-benzylamin wurde die Titelverbindung, wie im Beispiel 9 beschrieben, hergestellt.

30 Beispiel 17

N-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzyloxycarbonyl]-diclofenac (Verbindung 17)

35 Ausgehend von 4-(6-Methyl-2,3,4-tri-O-acetyl-beta-D-glucuronyloxy)-benzyl-alkohol und Diclofenac wurde die Titelverbindung, wie im Beispiel 7 beschrieben, hergestellt.

Beispiel 18

40 N-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzyloxycarbonyl]-flufenaminsäure (Verbindung 18)

Ausgehend von 4-(6-Methyl-2,3,4-tri-O-acetyl-beta-D-glucuronyloxy)-benzyl-alkohol und Flufenaminsäure wurde die Titelverbindung, wie im Beispiel 7 beschrieben, hergestellt.

45 Beispiel 19

4-N-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzyloxycarbonyl]-4-methylaminophenazon (Verbindung 19)

50 Ausgehend von 4-(6-Methyl-2,3,4-tri-O-acetyl-beta-D-glucuronyloxy)-benzyl-alkohol und 4-Methylaminophenazon wurde die Titelverbindung, wie im Beispiel 7 beschrieben, hergestellt.

Beispiel 20

55 7-N-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzyloxycarbonyl]-theophyllin (Verbindung 20)

Ausgehend von 4-(6-Methyl-2,3,4-tri-O-acetyl-beta-D-glucuronyloxy)-benzyl-alkohol und Theophyllin wurde die Titelverbindung, wie im Beispiel 7 beschrieben, hergestellt.

Beispiel 21

60 1-N-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzyloxycarbonyl]-nifedipin (Verbindung 21)

Ausgehend von 4-(6-Methyl-2,3,4-tri-O-acetyl-beta-D-glucuronyloxy)-benzyl-alkohol und Nifedipin wurde die Titelverbindung, wie im Beispiel 7 beschrieben, hergestellt.

65 Beispiel 22

[4-(beta-D-glucuronyloxy)-3-nitrobenzyl]-2-[1-cyano-1-(N-4-trifluormethylphenyl)carbamoyl]propen-1-yl-carbo-

nat (Verbindung 22)

Der Chlorameisensäureester (4-[2,3,4-tri-O-Acetyl- β -D-glucopyranosyl] methyluronat)-3-nitro-benzoyloxycarbonylchlorid) läßt sich nach bekannten Methoden herstellen, z. B. aus Methyl-(4-hydroxymethyl-2-nitrophenyl-2, 3, 4-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranosid)uronat und Phosgen. Methyl-(4-hydroxymethyl-2-nitrophenyl-2, 3, 4-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranosid)uronat läßt sich aus Methyl-(2,3, 4-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)uronatbromid durch Umsetzung mit 2-Hydroxy-5-nitrobenzaldehyd und anschließende Reduktion gewinnen.

2-Cyano-3-hydroxy-N-(trifluormethylphenyl)crotonsäureamid ist der aktive Metabolit von Leflunomid, das Hydroxycrotonsäureamid-Derivat 2 (WO 91/17748). Es wird gemäß dort beschriebenem Beispiel 4B durch alkalische Ringöffnung von Leflunomid gewonnen.

5.5 g (0.091 Mol) 4-[(2,3,4-tri-O-Acetyl- β -D-glucopyranosyl) methyluronat]-3-nitro-benzoyloxycarbonylchlorid und 2.7 g (0.01 Mol) 2-Cyano-3-hydroxy-N-(trifluormethylphenyl)crotonsäureamid werden in 80 ml Acetonitril gelöst. Nach Zugabe von 1.7 g (0.01 Mol) AgNO₃ wird unter Rühren 3 Stunden auf 60° C erhitzt. Das nach dem Abkühlen und Abfiltrieren erhaltene Filtrat wird unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde in 200 ml Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) gelöst und mit 1.5 g Bariumoxid versetzt. Der Ansatz wurde 5 h gerührt und das nach dem Abfiltrieren erhaltene Filtrat bis zur Trockne eingedampft. Nach säulenchromatographischer Reinigung erhält man so die Verbindung 22.

Beispielhaft wurde die pharmakologische Wirksamkeit der in den Beispielen 1—22 synthetisierten Substrat-Spacer-Wirkstoff Verbindungen (in folgenden Prodrug genannt) in vivo in relevanten tierexperimentellen Systemen getestet. Für die onkologische Indikation wurde ein Modell gewählt, in dem humane Tumore subkutan auf nackte Mäuse transplantiert werden und die erfindungsgemäßen Prodrugs nach Etablierung des Tumors i.v. appliziert wurden.

Beispiel 23

Ermittlung der akuten Toxizität

Zur Ermittlung der akuten Toxizität wurden Nacktmäusen (CD-1, nu/nu) am Tag 0 unterschiedliche Dosen der Testsubstanz, gelöst in 0.5 ml 5% Glucose-Lösung, über einen Zeitraum von 5 Minuten infundiert. Kontrollgruppen erhalten lediglich 0.5 ml, 5% Glucose-Lösung. Pro Konzentration der Restsubstanz werden 5 Mäuse verwendet. Am Tag 14 wird die Zahl der überlebenden Mäuse ermittelt und nach der Litchfield Wilcoxon Methode die LD₅₀ ermittelt. Die Toxizität der untersuchten Prodrug im Vergleich zum Wirkstoff (Adriamycin) ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

Akute Toxizität in Nacktmäusen

Substanz	LD ₅₀ (mg/kg)
14-O-[4-(beta-D-glucoronyloxy)-3-nitrobenzylaminocarbonyl]-doxorubicin	> 1500
Doxorubicin	20

Beispiel 24

Inhibition des Wachstums von subkutan in der Nacktmaus wachsenden Humantumoren

Die wachstumshemmende Aktivität der Testsubstanzen wurde in Anlehnung an die von Fiebig et al. (Proc. Europ. Soc. Med. Oncol. in Cancer Chemother. Pharmacol. Suppl. 9, 18, 1982; Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 88, 966, 1982) und Inoue et al. (Cancer Chemother. Pharmacol. 10, 182—186, 1983) beschriebene Methode geprüft. Die getesteten Humantumoren werden routinemäßig in Nacktmäusen gehalten und passagiert. Die Tumore werden bei jeder 3. Passage auf ihren humanen Charakter durch Immunhistochemie mit monoklonalen Antikörpern geprüft. Der Tumor wird unter sterilen Bedingungen entfernt und in kleine Stücke von etwa 5-10 mm³ zerschnitten. Je ein Tumorstückchen wird subkutan in die Seite einer Nacktmaus implantiert. Nach ca. 7—14 Tagen ist das Tumorstückchen im umgebenden Gewebe angewachsen und die Tumorgroße A wird mit Hilfe einer Schieblehre und Messung zweier gegenüberliegender Durchmesser (a, b) nach folgender Formel bestimmt:

$$A = a \times b.$$

Nach einer erneuten, im Abstand von 3 Tagen vorgenommenen Messung der Tumorgroße werden die Tiere in die Kontrollgruppe und die zu behandelnden Gruppen (jeweils 6 Tiere/Gruppe) randomisiert. Hierbei werden nur Tiere verwendet, bei denen ein progressives Tumorstückchen festgestellt wurde. Beginnend mit dem Tag der Randomisierung (Tag -7) werden die Tiere gemäß dem unten angegebenen Schema mit den Testsubstanzen behandelt. Zweimal pro Woche werden die beiden Tumordurchmesser für jede Maus gemessen und die individuellen Tumorrobenflächen werden entsprechend der oben genannten Formel berechnet.

Nach Beendigung des Experimentes werden die relativen Tumorgroßen für jedes individuelle Tier zum jeweiligen Meßtag gemäß der Formel: $A_r = A_{\text{tag } x} / A_{\text{tag } 0}$ berechnet. Danach wird der Median der behandelten Gruppe (A_r) in Beziehung zum Median der relativen Tumorgroße der Kontrolle (A_c) gesetzt und

$T/C \% = V_T / V_C \times 100$ berechnet. Die statistische Signifikanz des antitumoralen Effektes wird mit Hilfe des Wilcoxon U-Testes bestimmt.

Ergebnis

Tabelle 2

Wirksamkeit gegenüber subkutan in der Nacktmaus wachsenden humanen Colontumoren (LOVO)

Substanz	Dosis (mg/kg)	Behandlungs- schema	T/C (%)	Signifikanz (p < 0.05)
Prodrug*	500	1x i.v., d0	40.0	+
Fusions- protein + Prodrug	30	1x i.v., d-7	42.0	+
Doxorubicin	500	1x i.v., d0	78.4	

*: 14-O-[4-(beta-D-glucuronyloxy)-3-nitro-benzylaminocarbo-
nyl]-doxorubicin

Beispiel 25

Pharmakokinetik von Prodrug und Adriamycin in tumortragenden Nacktmäusen

Zur Evaluierung der Konzentrationen an Prodrug und Adriamycin in Gewebe und Tumor wurde die Prodrug (500 mg/kg) bzw. Doxorubicin (10 mg/kg) in Nacktmäuse, denen 14 Tage zuvor ein humaner Colontumor (Mz-Sto-1) subkutan implantiert worden war, über einen Zeitraum von 5 min infundiert. Nach der Infusion wurden die Tiere zu unterschiedlichen Zeiten getötet und die Organe bzw. der Tumor entnommen. Zu je 230 mg Gewebe wurde 770 µl 20 mM Phosphat-Puffer, 10 mM Saccharolacton, pH 3.0, hinzugegeben und die Proben mit Hilfe eines Ultraturrax homogenisiert. Zu je 200 µl dieses Homogenates wurden 40 µl 3.3% Silbernitratlösung sowie 160 µl Acetonitril hinzugegeben. Nach 30minütigem Schütteln der Proben und anschließender Zentrifugation (5 min, 12 000 g) wurden 100 µl des Überstandes abgenommen, mit 300 µl Phosphat-Puffer, 10 mM Saccharolacton, pH 6.0, verdünnt, der Gehalt an Prodrug bzw. Doxorubicin mittels automatischer Vorsäulenextraktion über C-18 Bondelut-Kartuschen (AASP) und Hochdruckflüssigkeitschromatographie analysiert.

Ergebnisse

Tabelle 3

Pharmakokinetik Prodrug und Adriamycin in tumortragenden Nacktmäusen

Substanz		Prodrug (500 mg/kg)	Doxorubicin (10 mg/kg)	Doxorubicin (10 mg/kg)	
Organ	Zeit nach Applikation (h)	Prodrug ($\mu\text{g/g}$)	Doxorubicin ($\mu\text{g/g}$)	Doxorubicin ($\mu\text{g/g}$)	
Tumor Mz-Sto-1	0.5	5.70	4.70	1.40	15
	1.0	10.10	11.40	2.20	
	4.0	16.10	16.40	1.80	
	8.0	16.90	9.20	1.40	
Herz	0.5	4.03	4.78	9.13	20
	1.0	4.45	5.08	10.74	
	4.0	3.38	4.17	14.26	
	8.0	2.12	3.21	5.82	
Leber	0.5	131.00	11.56	23.00	25
	1.0	165.40	13.24	23.00	
	4.0	27.65	8.17	17.00	
	8.0	6.52	6.04	9.74	
Lunge	0.5	6.53	6.74	12.10	30
	1.0	5.19	10.17	15.47	
	4.0	4.75	9.30	21.91	
	8.0	6.75	5.00	15.30	
Niere	0.5	19.50	18.21	57.00	35
	1.0	15.20	53.87	39.50	
	4.0	10.88	14.00	30.20	
	8.0	12.68	11.56	14.91	
Milz	0.5	5.21	6.76	19.43	40
	1.0	6.10	9.74	4.47	
	4.0	7.99	13.47	4.82	
	8.0	2.091	7.25	3.91	
Muskel	0.5	1.90	1.99	3.46	45
	1.0	2.13	2.87	9.56	
	4.0	2.30	2.74	4.69	
	8.0	2.20	2.00	5.21	

Patentansprüche

1. Verbindung der allgemeinen Formel Substrat-Spacer-Wirkstoff, **dadurch gekennzeichnet**, daß Substrat und Spacer unter physiologischen oder pathophysiologischen Bedingungen vom Wirkstoff abspaltbar sind, wobei das Substrat kein Aminosäure- oder Peptidrest ist und Wirkstoff eine chemische Substanz mit biologischer Wirkung oder ihre durch Einführung zusätzlicher Hydroxy-, Amino- oder Iminogruppen erhaltenen Derivate, ausgenommen ein über ein Stickstoffatom gebundenes Anthrazyklin, Paranitroanilid oder Cytosinarabinosid, bedeutet.

2. Verbindung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Substrat durch enzymatische Hydrolyse, aber nicht proteolytisch abgespalten werden kann.

3. Verbindung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Spacer durch chemische Hydrolyse spontan abgespalten werden kann.

4. Verbindung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Wirkstoff ein Pharmazeutikum oder eines

seiner durch Einführung zusätzlicher Hydroxy-, Amino- oder Iminogruppen erhaltenen Derivate ist.

5. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie hydrophiler ist als der Wirkstoff.

6. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie in vivo zu weniger toxischen Reaktionen führt als der Wirkstoff als solcher.

7. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff eine pharmakologisch wirksame Substanz ist.

8. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff das Tumorstadium verlangsamt.

9. Verbindung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Standardzytostatikum ist.

10. Verbindung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Antimetabolit ist.

11. Verbindung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff 5-Fluorouracil, 5-Fluorouridin, 5-Fluorocytidin, Cytosinarabinsid oder Methotrexat ist.

12. Verbindung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff eine in die DNA interkalierende Substanz ist.

13. Verbindung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff Doxorubicin, Daunomycin, Idarubicin, Epirubicin oder Mitoxantron ist.

14. Verbindung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff die Topoisomerase I + II hemmt.

15. Verbindung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff Camptothecin, Etoposid oder M-AMSA ist.

16. Verbindung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Tubulinhemmer ist.

17. Verbindung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff Vincristin, Vinblastin, Vindesin, Taxol, Nocodaxol, Colchicin oder Etoposid ist.

18. Verbindung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Alkylanz ist.

19. Verbindung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff Cyclophosphamid, Mitomycin C, Rachelmycin, Cisplatin, Phosphoramid-Senfgas, Melphalan, Bleomycin, Stickstoff-Senfgas, N-Bis-(2-chlorethyl)-4-hydroxyanilin oder Verrucarin A ist.

20. Verbindung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff Neocarzinostatin, Calicheamicin, Dynemicin oder Esperamicin A ist.

21. Verbindung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Tyrosinphosphokinaseinhibitor ist.

22. Verbindung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff Quercetin, Genistein, Erbstatin, Tyrphostin oder ein Rohitukinderivat ist.

23. Verbindung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Differenzierungsinduktor ist.

24. Verbindung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff Retinolsäure, Buttersäure, Phorbolster, DMSO oder Aclacinomycin ist.

25. Verbindung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Hormon, Hormonagonist bzw. Hormonantagonist ist.

26. Verbindung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff Progesteron, Buserelin, Tamoxifen, Mifepriston oder Onapriston ist.

27. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff eine Substanz ist, welche, die pleiotrope Resistenz gegenüber Zytostatika verändert.

28. Verbindung nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Calmodulin-Inhibitor ist.

29. Verbindungen nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Proteinkinase C-Inhibitor ist, vorzugsweise Pyridinyloxazol-2-on, Quinolyl- oder Isoguinolyloxazolone-2-on, Staurosporin oder ein Ethanolaminderivat.

30. Verbindung nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß Wirkstoff ein P-Glykoprotein-Inhibitor ist, insbesondere ein Ionenkanalblocker, vorzugsweise ein Ca-Ionenkanalblocker, wie z. B. Verapamil, vorzugsweise dessen R-Isomer sowie Varianten hiervon, oder zusätzliche Varianten, bei denen eine der phenolischen Methoxygruppen oder ein Proton durch eine Hydroxy- oder eine Aminogruppe, oder die Methylgruppe am tertiären Amin durch ein Proton ersetzt wird, oder Forskolin und 1,9-Dideoxyforskolin, Nifedipin, Quinin, oder an Antiarrhythmikum wie z. B. Quinidin.

31. Verbindung nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Modulator der mitochondrial gebundenen Hexokinase ist, vorzugsweise Lonidamin.

32. Verbindungen nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Inhibitor der gamma-Glutamylcysteinsynthetase, vorzugsweise Buthioninsulfoximin, oder der Glutathion-S-transferase ist.

33. Verbindung nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Inhibitor der Superoxid-dismutase ist, vorzugsweise Diethyldithiocarbamat.

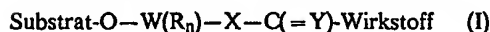
34. Verbindung nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff einen Inhibitor des durch den MAk Ki67 definierten proliferationsassoziierten Proteins im Zellkern sich teilender Zellen darstellt.

35. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff eine Substanz ist, die immun-suppressive Effekte ausübt.

36. Verbindung nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Standardimmunsuppressivum ist.

37. Verbindung nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff Cyclosporin A, Azathioprin, Methotrexat, Cyclophosphamid, Chlorambucil, Hydroxycrotonsäureamid-Derivat 2, 15-Deoxyspergualin, FK 506 oder Rapamycin ist.

38. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff eine Substanz ist, die antiinflammatorische Wirkung hat.
39. Verbindung nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff eine nicht steroidale antiinflammatorische Substanz ist, vorzugsweise Ibuprofen, Indomethacin oder Aspirin.
40. Verbindung nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff eine slow acting anti-rheumatic drug ist, vorzugsweise Sulfasalazin, Penicillinamin, Chloroguin. 5
41. Verbindungen nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Steroid darstellt, vorzugsweise Dexamethason oder Prednisolon.
42. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff eine Substanz ist, die antiphlogistische, analgetische oder antipyretische Wirkung hat.
43. Verbindung nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Derivat einer organischen Säure darstellt, vorzugsweise Salicylsäure, p-Aminosalicylsäure, Diclofenac, Flufenaminsäure oder Mefonaminsäure. 10
44. Verbindungen nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein nicht saures Analgetikum/Antiphlogistikum darstellt, vorzugsweise Paracetamol, 4-Aminophenazon, 4-Methylaminophenazon. 15
45. Verbindung nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff Oxyphenbutazon ist.
46. Verbindung nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Ca^{++} Antagonist ist, vorzugsweise Nifedipin.
47. Verbindung nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Antihistaminikum ist, vorzugsweise Terfenadin. 20
48. Verbindung nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Hemmstoff der Phosphodiesterase ist, vorzugsweise Theophyllin.
49. Verbindung nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Parasympathomimetikum ist, vorzugsweise Muskosin.
50. Verbindung nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Sympathomimetikum ist, vorzugsweise Terbutalin, Fenoterol, Sulbutamol, Orciprenalin, oder Isoprenalin. 25
51. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff eine Substanz mit lokalanästhetischer Wirkung ist.
52. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff eine Substanz mit antiarrhythmischer Wirkung ist. 30
53. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff eine Substanz mit inhibitorischer Wirkung auf die humane Urokinase ist, vorzugsweise Amilorid oder p-Nitrophenylguanidinobenzoat.
54. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Verbindung der Formel I



ist, worin

Substrat ein enzymatisch abspaltbares Kohlenhydrat,

$\text{W}(\text{R}_n)$ ein aromatisches carbocyclisches oder heteroaromatisches System oder aliphatisches System mit konjugierten Doppelbindungen oder eine nach Abspaltung des Substrats zyklisierendes Aminosäurederivat, bei dem die Substituenten R_n unabhängig oder gleich 40

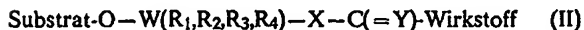
H, Methyl, Methoxy, Carboxy, Methyloxycarbonyl, CN, Hydroxy, Nitro, Fluor, Chlor, Brom, Sulfonyl, Sulfonamid oder Sulfon (C_{1-4})-alkylamid sind,

X O, NH, methylenoxy, methylenamino oder methylen-(C_{1-4})-alkylamino und

Y O oder NH ist, und 45

Wirkstoff eine Verbindung wie in Anspruch 1 bedeutet.

55. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Verbindung der Formel II,



ist, worin 50

Substrat ein enzymatisch abspaltbares Kohlenhydrat,

$\text{W}(\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4)$ ein Phenylrest oder ein mehrfach substituierter Phenylrest, bei dem die Substituenten $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3$, und R_4 unabhängig oder gleich H, Methyl, Methoxy, Carboxy, Methyloxycarbonyl, CN, Hydroxy, Nitro, Fluor, Chlor, Brom, Sulfonyl, Sulfonamid oder Sulfon (C_{1-4})-alkylamid sind, 55

X O, NH, methylenoxy, methylenamino oder methylen-(C_{1-4})-alkylamino und

Y O oder NH ist, und

Wirkstoff eine Verbindung wie in Anspruch 1 bedeutet.

56. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Verbindung der Formel II ist, worin Substrat ein 60

enzymatisch abspaltbares Kohlenhydrat

$\text{W}(\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4)$ ein Phenylrest oder ein monosubstituierter Phenylrest, bei dem einer der Substituenten $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3$, oder R_4 Methoxy, Methyloxycarbonyl, CN, Hydroxy, Nitro, Fluor, Chlor, Brom, Sulfonyl oder Sulfonamid ist und die übrigen Wasserstoff sind, 65

X O, NH, methylenoxy, methylenamino oder methylenmethylamino und

Y O oder NH ist und

Wirkstoff eine Verbindung wie in Anspruch 1 bedeutet.

57. Verbindung nach Anspruch 54, 55, 56 dadurch gekennzeichnet, daß

Wirkstoff eine über eine Hydroxy-, Amino- oder Iminogruppe verknüpfte Verbindung mit biologischer Wirkung,

beispielhaft ausgewählt aus der Gruppe Etoposide, N-Bis-(2-chlorethyl)-4-hydroxyanilin, 4-Hydroxycyclophosphamid, Doxorubicin, 4'-epi-Doxorubicin, 4-oder 4'-Desoxy-doxorubicin, Vindesin, Vinblastin, Vincristin, Terfenadin, Terbutalin, Fenoterol, Salbutamol, Muscarin, Oxyphenbutazon, Salicylsäure, p-Aminosalicylsäure, 5-Fluorouracil, 5-Fluorouridin, 5-Fluorocytidin, Methotrexat, Diclofenac, Flufenaminsäure, 4-Methylaminophenazon, Theophyllin, Nifedipin, Mitomycin C, Mitoxantron, Camptothecin, m-AMSA, Taxol, Nocodaxol, Colchicin, Cyclophosphamid, Rachelmycin, Cisplatin, Melphalan, Bleomycin, Stickstoff-Senfgas, Phosphoramid-Senfgas, Verrucarin A, Neocarzinostatin, Calicheamicin, Dynemicin, Esperamicin A, Quercetin, Genistein, Erbstatin, Tyrphostin, Rohitukinderivat, Retinolsäure, Buttersäure, Phorbolster, DMSO, Aclacinomycin, Progesteron, Buserelin, Tamoxifen, Mifepriston, Onapriston, N-(4-aminobutyl)-5-chloro-2-naphtalen-sulfonamid, Pyridinyloxazol-2-on, Quinolyl-, Isoguinolyloxazolone-2-on, Staurosporin, Ethanolamin, Verapamil, Forskolin, 1,9-Dideoxyforskolin, Quinin, Quinidin, Lonidamin, Buthioninsulfoximin, Dihydithiocarbamat, Cyclosporin A, Rapamycin, Azathioprin, Chlorambucil, Hydroxycrotonsäureamid-Derivat 2, 15-Deoxyspergualin, FK 506, Ibuprofen, Indomethacin, Aspirin, Sulfasolazin, Penicillinamin, Chloroguin, Dexamethason, Prednisolon, Mefonaminsäure, Paracetamol, 4-Aminophenazon, Muskosin, Orciprenalin, Isoprenalin, Amilorid, p-Nitrophenylguanidinobenzoat oder deren durch eine oder mehrere Hydroxy-, Amino- oder Iminogruppen zusätzlich substituierte Derivate bedeutet.

58. Verfahren zur Herstellung einer Glycosidase-spaltbaren Verbindung nach Formel II, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Phenyl-glycosid der Formel III,



worin

Substrat ein alpha- oder beta-O-glycosidisch verknüpfter 6-O-Metyl-D-glucuronyl-, D-Glucopyranosyl-, D-Galactopyranosyl-, N-Acetyl-D-glucosaminyl-, N-Acetyl-D-galactosaminyl-, D-Mannopyranosyl- oder L-Fucopyranosylrest, dessen Hydroxygruppen frei oder mittels Acetyl- oder Mono-, Di- oder Trihalogenacetylenschutzgruppen mit Halogen Fluor oder Chlor oder Benzylschutzgruppen geschützt sind,

W(R₁, R₂, R₃, R₄) ein Phenylrest oder ein mono- oder mehrfach substituierter Phenylrest mit Substituenten R₁, R₂, R₃, R₄ gleich oder unterschiedlich H, Methyl, Methoxy, Carboxy, Methyloxy-carbonyl, CN, Hydroxy, Nitro, Fluor, Chlor, Brom, Sulfonyl, Sulfonamid oder Sulfon-(C₁₋₄)-alkylamid, XO, NH, methylenoxy, methylenamino oder methylen-(C₁₋₄)-alkylamino, YO oder NH und

Z eine reaktive Abgangsgruppe ausgewählt aus der Gruppe Chlorid, Bromid, Azid oder N-Succinimid-oxy ist,

mit einer Wirkstoff-Verbindung ausgewählt aus der Gruppe 2'',3''-Di-O-chloracetyl-etoposide, N-Bis-(2-chlorethyl)-4-hydroxyanilin, 4-Hydroxy-cyclophosphamid, 3'-N-Fluorenylmethyloxy-carbonyl-geschützte Anthracycline Doxorubicin, 4'-epi-Doxorubicin, 4-oder oder 4'-Desoxy-doxorubicin, Vindesin, Vinblastin, Vincristin, 5-Fluorouracil, 5-Fluorouridin, 5-Fluorocytidin, Methotrexat oder Mitomycin C über eine reaktive Hydroxy-, Amino- oder Iminogruppe in Gegenwart einer organischen Base ausgewählt aus der Gruppe Triethylamin, Diisopropylethylamin oder Dimethylaminopyridin und einem Lösungsmittel ausgewählt aus der Gruppe Acetonitril, Dioxan, Tetrahydrofuran, Dichlormethan oder Dichlorethan zu einer geschützten Zwischenverbindung umgesetzt und anschließend die Schutzgruppen hydrolytisch mit Alkalilauge, Alkalicarbonat, Alkalicyanid, Bariumoxid, Piperidin oder Morpholin in Gegenwart von Methanol, Ethanol oder Wasser abspaltet, wobei eine Verbindung der Formel II entsteht,

worin

Substrat ein alpha- oder beta-O-glycosidisch verknüpfter D-Glucuronyl-, D-Glucopyranosyl-, D-Galactopyranosyl-, N-Acetyl-D-glucosaminyl-, N-Acetyl-D-galactosaminyl-, D-Mannopyranosyl- oder L-Fucopyranosylrest,

W(R₁, R₂, R₃, R₄) ein Phenylrest oder ein mono- oder mehrfach substituierter Phenylrest mit Substituenten R₁, R₂, R₃, R₄ gleich oder unterschiedlich H, Methyl, Methoxy, Carboxy, Methyloxy-carbonyl, CN, Hydroxy, Nitro, Fluor, Chlor, Brom, Sulfonyl, Sulfonamid oder Sulfon-(C₁₋₄)-alkylamid, XO, NH, methylenoxy, methylenamino oder methylen-(C₁₋₄)-alkylamino, YO oder NH und

Wirkstoff eine über eine Hydroxygruppe verknüpfte pharmakologisch wirksame Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe Etoposide, N-Bis-(2-chlorethyl)-4-hydroxyanilin, 4-Hydroxycyclophosphamid, Doxorubicin, 4'-epi-Doxorubicin, 4-oder 4'-Desoxy-doxorubicin, Vindesin, Vinblastin oder Vincristin oder eine über Amino- oder Iminogruppe verknüpfte pharmakologisch wirksame Verbindung ausgewählt aus der Gruppe 5-Fluorouracil, Methotrexat oder Mitomycin C bedeuten.

59. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 54 bis 57, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat ein alpha- oder beta-O-glycosidisch verknüpfter D-Glucuronyl-, D-Glucopyranosyl-, D-Galactopyranosyl-, N-Acetyl-D-glucosaminyl-, N-Acetyl-D-galactosaminyl-, D-Mannopyranosyl- oder L-Fucopyranosylrest ist.

60. 4'-O-[4-(alpha-D-Glucopyranosyloxy)-phenylaminocarbonyl]-etoposid.

61. 4'-O-[4-(beta-D-Glucopyranosyloxy)-phenylaminocarbonyl]-etoposid.

62. 4'-O-[4-(alpha-D-Galactopyranosyloxy)-phenylaminocarbonyl]-etoposid.

63. 4'-O-[4-(beta-D-Glucuronoyloxy)-phenylaminocarbonyl]-etoposid.

64. 4'-O-[4-(beta-D-Glucuronoyloxy)-3-nitro-benzylaminocarbonyl]-etoposid.

65. 4'-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-3-chlor-benzylaminocarbonyl]-etoposid.
 66. 1-N-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzyloxycarbonyl]-mitomycin C.
 67. 14-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-3-nitro-benzylaminocarbonyl]-doxorubicin.
 68. 4-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-4-hydroxy-1-N-(bis-2-chlorethyl)-anilin.
 69. 4-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-terfenadin. 5
 70. 3'-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-terbutalin.
 71. 3'-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-fenoterol.
 72. 1''-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-salbutamol.
 73. 3-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-muscarin.
 74. 4'-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-oxyphenbutazon. 10
 75. 2-O-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzylaminocarbonyl]-salicylsäure.
 76. N-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzyloxycarbonyl]-diclofenac.
 77. N-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzyloxycarbonyl]-flufenaminsäure.
 78. 4-N-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzyloxycarbonyl]-4-methyl-aminophenazon.
 79. 7-N-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzyloxycarbonyl]-theophyllin. 15
 80. 1-N-[4-(beta-D-Glucuronyloxy)-benzyloxycarbonyl]-nifedipin.
 81. [4(beta-D-glucuronyl)-3-nitrobenzyl]-2-[1-cyano-1-(N-4-trifluormethylphenyl)carbamoyl]propen-1-yl-carbonat.
 82. Verbindung nach Anspruch 1 in einer geeigneten galenischen Darreichungsform als Arzneimittel, vorzugsweise Liposomen. 20
 83. Verbindung nach Anspruch 1 in Kombination mit einer Substanz, welche die "multi drug resistance" bricht, vorzugsweise Cyclosporin A, R-Verapamil, Pentoxifyllin oder Rapamycin.
 84. Verbindung nach Anspruch 1 in Kombination mit einem Immuntoxin. 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

- Leerseite -